

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. April 2003 (17.04.2003)

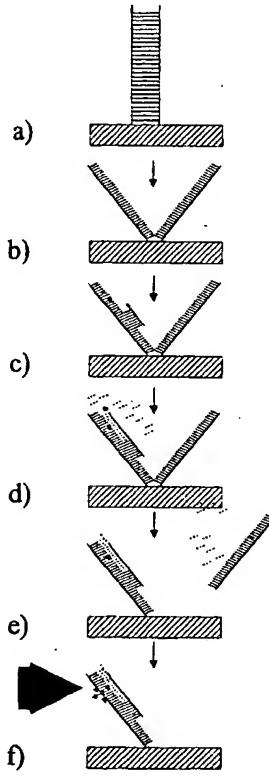
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/031649 A2

- | | | |
|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : | C12Q 1/68 | (72) Erfinder; und |
| (21) Internationales Aktenzeichen: | PCT/DE02/03845 | (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE). |
| (22) Internationales Anmeldedatum: | 4. Oktober 2002 (04.10.2002) | (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin (DE). |
| (25) Einreichungssprache: | Deutsch | (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. |
| (26) Veröffentlichungssprache: | Deutsch | |
| (30) Angaben zur Priorität: | 101 51 055.1 5. Oktober 2001 (05.10.2001) DE | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): | EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE). | |

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETERMINATION OF CYTOSINE METHYLATION IN CPG ISLANDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNG IN CPG-INSELN



(57) Abstract: A method for the determination of cytosine methylation in DNA samples is disclosed. The DNA is firstly extracted from the sample and bonded to a surface. In the second method step a genomic DNA sample is preferably treated with a bisulphite (= disulphite, hydrogen sulphite) in such a way that all non-methylated cytosine bases are converted to uracil, whilst the 5-methylcytosine bases remain unchanged. In the third method step one or several oligonucleotides are hybridised onto the treated DNA as primer. In the fourth method step the hybridised primer(s) are lengthened in a polymerase reaction. Marked guanine nucleotides are preferably used which are then essentially only incorporated when cytosine bases are still present in the treated DNA. Thereafter the measure of inclusion of guanine bases and thus the number of incorporated markings is proportional to the methylation in the sample under investigation. In the fifth method step the marked nucleotides not incorporated in the polymerase reaction are removed. In the sixth method step the number of markings in the fragment generated by the primary extension is approximately determined, whereby the signal intensity emitted by said markings is directly or indirectly measured.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben. Zuerst wird aus einer Probe die DNA extrahiert und an eine Oberfläche gebunden. Im zweiten Schritt wird eine genomische DNA-Probe bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosin-basen unverändert bleiben. Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man an die behandelte DNA ein oder mehrere Oligonukleotide als Primer. Im vierten Verfahrensschritt wird der oder werden die hybridisierten Primer in einer Polymeraseraktion verlängert. Dabei werden bevorzugt markierte Guaninnukleotide eingesetzt, die im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA noch Cytosinbasen vorlagen. Demnach ist das Ausmass des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe. Im fünften Verfahrensschritt werden die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide entfernt. Im sechsten Schritt des Verfahrens wird die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment näherungsweise bestimmt, indem von diesen Markierungen ausgehende Signalintensitäten direkt oder indirekt gemessen werden.

WO 03/031649 A2



(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in CpG
Inseln**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum besonders empfindlichen Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre 10 in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene 15 in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.

25 Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methyl-cytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 30 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

35 Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methyl-cytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von

Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related

modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen
5 (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Hor-
sthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of
Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic me-
thylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Ge-
net. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung ange-
wendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines
10 bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifi-
ziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter
J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation
imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne
15 Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“
(Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation
differences at specific sites using methylation-sensitive
single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic
Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-Patent
20 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW.
COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation as-
say. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nach-
gewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisie-
rung beschrieben worden (Olek et al., WO 99/28498).
25
Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-
Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in
genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA.
Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequenc-
30 ing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids
Res. 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bi-
sulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen
35 Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioassays. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Dörfler W. Imprinted segments in the human genome:
5 different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes:
10 improved protocol for bisulphate genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb. 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.
15

Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6). Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder unmethylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.
25
30
35 Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-

Light bekannt geworden ist (WO 00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigts.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonucleotide bei verminderter nichtspezifischen Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoresziert markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ih-

rer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

- 5 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur A-
nalyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nuk-
leinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S.
(1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ioniza-
tion Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Inno-
10 vations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren
ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für
Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überpro-
portional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ
15 geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF
Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent
wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind ei-
nige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die
eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es
20 zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch
wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht ver-
ringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert
werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass
sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnuklein-
25 säuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rück-
grats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich
durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale
DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedu-
re for selective DNA alkylation and detection by mass
30 spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die
Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA
resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den
gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein
weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte
35 Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den
Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie
5 Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Nach der Erfindung der PCR sind in den folgenden Jahren zahlreiche Varianten bekannt geworden, die diese Technik
10 zur Amplifikation der DNA verfeinern. Insbesondere ist hier die Multiplexierung der PCR (Multiplex-PCR) zu erwähnen, wobei man mehr als 2 spezifische Primer einsetzt und dabei in einem Reaktionsgefäß eine Vielzahl von verschiedenen, spezifischen Amplifikationen erzeugen kann.
15 Besonders interessant ist auch die sogenannte Nested PCR, welche unter anderem zum Nachweis besonders geringer DNA Mengen verwendet wird. Diese Art der PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen, wobei die Primer der zweiten Amplifikation innerhalb des ersten Amplifikates liegen und nicht mit den Primern der ersten Amplifikation identisch sind. Dadurch wird eine besondere Spezifität erreicht, da die Primer der zweiten Amplifikation nur dann funktionieren, wenn in der ersten Amplifikation das beabsichtigte Fragment erzeugt wurde. Dagegen ist die
20 Vermehrung etwaiger Nebenprodukte der ersten Amplifikation in der zweiten so gut wie ausgeschlossen.
25

Es sind demnach bislang vielerlei Verfahren zur Methylierungsanalyse Stand der Technik. Die vorliegende Erfindung soll jedoch eine Möglichkeit zur Analyse des Methylierungsgrades insgesamt in einer CpG Insel bereitstellen. Dabei ist es bevorzugt nicht erforderlich, eine Polymerasereaktion durchzuführen, was die Durchführung des Verfahrens erleichtert. Es ist im Rahmen einer Methylierungsanalyse im Bereich der klinischen Diagnostik wesentlich,
30 dass Untersuchungsergebnisse möglichst schnell zur Verfü-
35

gung gestellt werden können und dass sich der experimentelle Aufwand in möglichst engen Grenzen hält. Dazu ist das hier beschriebene Verfahren, welches das Ausmass der Methylierung in einer gesamten CpG Insel misst, in besonderem Massen geeignet. Im Gegensatz zu den meisten bislang beschriebenen Verfahren zur Methylierungsanalyse wird dabei nicht der Methylierungsstatus einer einzelnen oder mehrerer einzelner CpG Positionen bestimmt. In vielen Fällen wird dies auch keinen Vorteil bringen, da mitunter ganze Promotorregionen komethyliert vorliegen, das heisst viele aufeinanderfolgende CpG Positionen den gleichen Methylierungsstatus besitzen.

Die vorliegende Erfindung macht es sich nun zunutze, dass dieser Methylierungsstatus in zahlreichen zu untersuchenden Positionen als ähnlich angenommen wird und ein Signal erzeugt werden kann, welches aus der Summe dieser Einzelpositionen resultiert. Dies ermöglicht eine Empfindlichkeit, welche die Durchführung einer PCR Reaktion entbehrlich machen kann.

Auch macht es sich das Verfahren zunutze, dass Guaninbasen in Bisulfit behandelter DNA auf einem Strang nur dann in einer nachfolgenden Polymerasereaktion eingebaut werden, wenn in der entsprechenden genomischen DNA Probe ein methyliertes Cytosin vorlag. Enthält die Proben DNA an den betreffenden Positionen keine Methylierungen, so findet kein Einbau von Guanin in der Polymerasereaktion statt.

Umgekehrt, wenn in einer PCR-Reaktion zu der bisulfitbehandelten DNA auch ein Gegenstrang erzeugt wurde (nach der Bisulfitbehandlung sind die DNA Stränge der Probe nicht mehr wie ursprünglich komplementär), wird mit diesem Gegenstrang als Templat nur dann in einer nachfolgenden Polymerasereaktion ein Cytosin eingebaut, wenn ur-

sprünglich in der entsprechenden genomischen DNA Probe ein methyliertes Cytosin vorlag.

Daraus folgt, dass nur dann Guanine respektive Cytosine 5 eingebaut werden, wenn in der genomischen DNA Probe Methylierung vorlag. Das Ausmass des Einbaus der Guanine respektive Cytosine (je nach Verfahren, siehe oben) korreliert direkt mit dem Ausmass der Methylierung im jeweils untersuchten genomischen DNA Abschnitt.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht daher aus den folgenden Teilschritten:

Zuerst wird aus einer Probe die genomische DNA extrahiert 15 und dabei bevorzugt an eine Oberfläche gebunden, besonders bevorzugt erfolgt diese Bindung durch Hybridisierung an ein immobilisiertes Oligonukleotid und wiederum besonders bevorzugt wird die genomische DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten.

20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.

25

Es ist weiterhin erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingetetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Augen, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.

35

Der enzymatische Schnitt der DNA wird besonders bevorzugt mit einer Restriktionsendonuklease oder mehreren unterschiedlichen Restriktionsenzymen ausgeführt. Werden mehrere Restriktionsendonukleasen verwendet, so hängt es von

den jeweiligen Puffern ab, ob diese nacheinander oder gleichzeitig zum Einsatz kommen. Dem Fachmann ist die Anwendung von Restriktionsenzymen gemäß den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen bekannt.

5

Im zweiten Schritt wird eine genomische DNA-Probe bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen unverändert bleiben. Dies findet besonders bevorzugt an der Oberfläche statt, an die die Proben DNA im ersten Schritt bereits gebunden wurde.

Es ist ganz besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Bevorzugt ist es auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. Es ist auch und weiterhin bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.

Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man an die behandelte DNA ein oder mehrere Oligonukleotide als Primer.
25 Im vierten Verfahrensschritt wird der oder werden die hybridisierten Primer in einer Polymerasereaktion verlängert. Dabei werden markierte Guaninnukleotide eingesetzt, die im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA noch Cytosinbasen vorlagen. Demnach ist das Ausmass des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe. Besonders bevorzugt endet die Polymerasereaktion an der Position, die im ersten Schritt durch den Einsatz einer 30 Restriktionsendonuklease geschnitten wurde.
35

Im fünften Verfahrensschritt werden die in der Polymeraseaktion nicht eingebauten markierten Nukleotide entfernt. Besonders bevorzugt erfolgt dies durch einfache Waschschritte in dem Fall, dass die DNA an eine Oberfläche gebunden vorliegt.

5 Im sechsten Schritt des Verfahrens wird die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primerverlängerung erzeugten Fragment näherungsweise bestimmt, indem eine von diesen Markierungen ausgehende Signalintensität direkt oder 10 indirekt gemessen wird.

15 Aus der Signalintensität wird auf den Methylierungsstatus der DNA Probe in dem jeweils untersuchten Fragment geschlossen.

Markierungen können beispielsweise Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide, oder abspaltbare Massenmarkierungen sein, welche in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Es können jedoch auch Markierungen wie Peptide sein, die indirekt durch Bindung eines wiederum anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Es sind auch chemische Markierungen denkbar, die durch nachfolgende Umsetzung mit einem wiederum anders markierten 20 Markermolekül, welches zum Beispiel ein Fluoreszenzfarbstoff sein kann, erst sichtbar gemacht werden können. Dem Fachmann sind vielerlei Möglichkeiten geläufig, Moleküle mit Markierungen zu versehen. Die hier aufgeführten Möglichkeiten sollen daher als Beispiele verstanden werden, 25 und andere, dem Fachmann geläufige Möglichkeiten der Markierung sollen als Bestandteil dieser Erfindung betrachtet werden.

30 In den zuvor genannten Schritten wird auf die Amplifikation der behandelten DNA-Probe verzichtet. Das Verfahren ist daher vor allem dann anwendbar, wenn die Probenmenge

- nicht limitierend ist und die verwendeten Markierungen mit hinreichender Empfindlichkeit nachweisbar sind. Da jedoch bei der Untersuchung beispielsweise einer CpG Insel nach dem oben beschriebenen Verfahren eine Vielzahl von 5 Markierungen in der Polymerasereaktion eingebaut wird, wenn die CpG Insel methyliert vorlag, wird auch durch die Art des durchgeföhrten Verfahrens eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung erreicht.
- 10 Wird einer erhöhte Empfindlichkeit aufgrund einer nur geringfügigen DNA-Menge benötigt, so wird das oben beschriebene Verfahren durch eine PCR Reaktion oder eine andere nicht nur linear amplifizierende Polymerasereaktion ergänzt, welche nach der Behandlung gemäss dem zweiten 15 Verfahrensschritt durchgeföhr wird. Bevorzugt wird dabei die (chemisch) behandelte DNA-Probe unter Verwendung von bevorzugt mindestens 2 Primeroligonukleotiden mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert, wobei bevorzugt eine hitzebeständige Polymerase, Nukleotide sowie ein geeigneter Reaktionspuffer, wie meist mit der Polymerase geliefert und dem Fachmann bekannt, verwendet werden.
- 20 Besonders bevorzugt ist es auch, die Amplifikationen mehrerer unterschiedlicher Fragmente mit mehr als 2 verschiedenen Primern in einem Reaktionsgefäß durchzuführen und damit die Amplifikationsschritte als Multiplex-PCR auszuführen. Es ist generell besonders bevorzugt, die 25 Amplifikationen als Polymerasekettenreaktion auszuführen.
- 30 Soll weiterhin, auch unter Verwendung einer zusätzlichen PCR, an einer Oberfläche gearbeitet werden, so erfolgt entweder eine Festphasen-PCR in der Art, dass Primer für den PCR Schritt zusätzlich an die Oberfläche gebunden sind, oder es erfolgt nach der PCR bevorzugt ein Aufreinigungsschritt durch handelsübliche Aufreinigungskits 35 (wie beispielsweise von den Firmen Promega oder Qiagen)

und nachfolgende Bindung des PCR Produktes an eine Oberfläche, an welcher nun die weitere Polymerasereaktion zum Einbau der Markierungen erfolgen soll.

- 5 Bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation einer der Primer an eine Festphase gebunden ist. Bei diesen Festphasen kann es sich beispielsweise um funktionalisierte Polymere, Metalle, Glas oder Halbleiter wie Silicium handeln. Das Anbinden der Primer erfolgt bevorzugt über bifunktionale Linkermoleküle, welche an eine silanisierte Oberfläche gebunden werden oder aber beispielsweise über Thioate im Primer oder Thiolmodifikationen an Bromacetyl-derivatisierte Oberflächen oder Gold.
- 10
- 15 In einer weiteren, bevorzugten alternativen Variante des Verfahrens erfolgt der Einbau der Markierungen selbst in einer PCR Reaktion. In diesem Fall findet die Reaktion bevorzugt ohne Bindung der Primer an eine Festphase statt. Stattdessen erfolgt eine Abtrennung des PCR Produktes, beispielsweise durch Gelelektrophorese, von anderen Nebenprodukten und Edukten. Die Intensität der von den Markierungen ausgehenden Signale in den so erhaltenen Banden oder Bandenmustern wird bestimmt und so auf den Methylierungsgrad in dem untersuchten Fragment der Proben DNA geschlossen.
- 20
- 25

Wird auch in einer Amplifikation der komplementäre Gegenstrang zu den behandelten DNA Fragmenten erzeugt, so entsprechen in diesem Gegenstrang im Falle einer Behandlung mit einem Bisulfit Adenin einer nicht methylierten Cytosinposition und Guanin einer methylierten Cytosinposition in der DNA-Probe. Daher ist es nach Amplifikation auch möglich, das Verfahren sinngemäß auch mit einem markierten Cytosin auszuführen.

Die in den Polymerasereaktionen verwendeten Primer amplifizieren besonders bevorzugt keine Fragmente aus nicht mit Bisulfit behandelter genomischer DNA (oder nur in vernachlässigbarem Ausmaß), so dass sie für die mit Bisulfit umgewandelte DNA spezifisch sind. Dies schützt vor fehlerhaften Ergebnissen im Falle einer unvollständigen Umwandlungsreaktion mit beispielsweise Natriumbisulfit.

Bevorzugt ist es ferner, dass die Analyse mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays erfolgt, wobei Oligomere Nukleinsäuren oder in ihren Hybridisierungseigenschaften ähnliche Moleküle wie PNAs sein können.

Es ist bevorzugt, dass der Methylierungsstatus von mehr als 10 Methylierungspositionen der zu analysierenden DNA in einem Experiment nachgewiesen wird.

Auch ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Analyse durch zusätzliche Längenmessung der amplifizierten zu untersuchenden DNA erfolgt, wobei Methoden zur Längenmessung Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese, Chromatographie (z.B. HPLC), Massenspektrometrie und andere geeignete Methoden umfassen. Die Fragmente werden dabei über die in der Polymerasereaktion eingebauten Markierungen detektiert.

Weiterhin ist bevorzugt, dass man aus dem Methylierungsgrad an einzelnen oder mehreren verschiedenen untersuchten CpG Inseln auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.

Bevorzugt werden die Markierungen entweder durch eine Markierung der Nukleotide während der Polymerasereaktion oder Amplifikation in die erzeugten markierten Fragmente eingebracht.

- Weiterhin besonders vorteilhaft ist es, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder/und dass die Markierungen Radionuklide sind oder/und dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem
- 5 Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, dass die Fragmente insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 10 Dabei trägt jede eingebaute Markierung eine für die Methylierung spezifisch zusätzliche Masse bei, so dass aus der gemessenen Molekülmasse auf die Anzahl der Methylierungen in der CpG Insel geschlossen werden kann.
- 15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität
- 20 und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit;
- 25 Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 30
- 35

Vorteilhaft ist dabei die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern für die Polymerasereaktion, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Assays. Zusätzlich ist auch eine Mikrotiterplatte, die für die Immobilisierung der Proben-DNA eine aktivierte Oberfläche besitzt und in der auch nachfolgende Reaktionsschritte ausgeführt werden können, bevorzugter Bestandteil dieses Kits.
- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren besteht demnach aus den folgenden Teilschritten:
 - a) aus einer Probe wird DNA extrahiert,
- 15 b) die DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
- 20 c) ein oder mehrere Oligonukleotidprimer werden an die behandelte DNA hybridisiert,
- 25 d) die hybridisierten Primer werden in einer Polymerasereaktion verlängert, wobei markierte Nukleotide im wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der behandelten DNA nach Schritt b) noch Cytosinbasen vorlagen und wobei das Ausmass des Einbaus der markierten Nukleotide zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe korreliert,
- 30
- 35

- e) die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide werden entfernt,
- 5 f) die Anzahl der Markierungen in dem durch die Primer-verlängerung erzeugten Fragment wird näherungsweise bestimmt, indem eine von diesen Markierungen ausgehende Signalintensität gemessen wird.
- 10 Besonders bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums gewinnt.
- 15 Besonders bevorzugt ist es, dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.
- 20 Es ist zudem besonders bevorzugt, dass man die Behandlung nach Anspruch 1b) mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt. Besonders bevorzugt ist auch, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose oder besonders bevorzugt nach Bindung der DNA an eine Oberfläche erfolgt. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante ist bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen.
- 25
- 30 Es ist zudem besonders bevorzugt, dass aus einer Probe genomische DNA extrahiert wird und dabei an eine Oberfläche gebunden wird. Besonders bevorzugt ist es auch, dass diese Bindung durch Hybridisierung an ein immobilisiertes Oligonukleotid erfolgt. Es ist zudem bevorzugt, dass die

extrahierte DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten wird.

- 5 In einer besonders bevorzugten Verfahrensausführung hybridisiert man an die behandelte DNA mehrere verschiedene Oligonukleotide als Primer.

10 Besonders bevorzugt werden die markierten Nukleotide Guaninderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag. Zudem ist bevorzugt, dass das Ausmaß des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional ist zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe.

15 In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante endet Polymerasereaktion bevorzugt an der Position, die vor der DNA Isolierung durch den Einsatz einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurde.

20 In einer weiteren bevorzugten Verfahrensvariante werden die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten markierten Nukleotide durch Waschschrifte entfernt und die DNA liegt an eine Oberfläche gebunden vor.

25 Die Markierungen sind bevorzugt Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide, Chemiluminiszenzmarkierungen oder abspaltbare Massenmarkierungen sind, welche in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Es ist auch bevorzugt, dass die Markierungen indirekt durch Bindung eines wiederum anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden.

30 35 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die behandelte DNA-Probe unter Verwendung

- von bevorzugt mindestens zwei Primeroligo-nukleotiden vorzugsweise mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante sind die markierten Nukleotide Cytosinderivate, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.
- 10 Bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchführt.
- 15 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird mindestens einer der Amplifikationen einer der jeweiligen Primer an eine Festphase gebunden.
- 20 Verfahren nach einem der voranstehenden, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplikate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines der beschriebenen Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verlet-

zung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonval-
leszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Kör-
pers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bin-
5 degewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen
oder sexuelle Fehlfunktion.

Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist die Verwendung eines
10 Verfahrens nach einem der vóranstehenden Ansprüche zur
Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Unter-
suchung der Zelldifferenzierung.

Kurzbeschreibung der Figuren

15 Fig. 1 erläutert ein besonders bevorzugte Variante der
Erfindung:

20 a) enzymatisch geschnittene Proben-DNA wird an eine Ober-
fläche gebunden und dabei von Begleitmaterial abgetrennt

b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird denaturiert
und anschliessend bepielsweise mit einem Bisulfit che-
misch behandelt

25 c) ein Primer wird an die DNA gebunden

d) eine enzymatische Primerextensionsreaktion (Nukleotide
dargestellt als gestrichelte Linien: ---) wird durchge-
führt, und es werden nur dann Markierungen eingebaut,
wenn zuvor in der Proben-DNA an den betreffenden Positio-
nen Cytosin-Methylierungen (*) vorlagen

30 e) die übrigen markierten Nukleotide und Reaktionskompo-
nenten werden in einem Waschschnitt entfernt

f) die Fluoreszenzintensität ausgehend von den eingebauten Markierungen wird gemessen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

5

Beispiel 1:

Bisulfit-Behandlung von DNA an festen Oberflächen

Im folgenden werden zwei Verfahren beschrieben, um DNA an einer festen Phase zu binden:

10 a) Verwenden von Reaktionsgefäßern

Für die Anbindung von DNA auf die Oberfläche der Reaktionsgefäß wurde EcoRI geschnittene genomische DNA (Promega) verwendet. 160ng wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäß pipettiert, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt, auf einem Shaker kurz gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Gefäß zweimal mit 50µl Wasser gewaschen. Um die Aktivität der verbleibenden Bindungsstellen auf der Tubeoberfläche herabzusetzen, wurden 15 10µl einer 5%igen Bovin-Serum-Albumin Lösung hinzu pipettiert, mit 40µl Wasser aufgefüllt und ebenfalls bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurde das Gefäß einmal mit 50µl Wasser gewaschen.

25 Bisulphit Behandlung:

Die angebundene DNA wird bei 96°C für 20 Minuten in einem Eppendorf-Mastercycler denaturiert. Für die Bisulfitreaktion wurde eine Natriumbisulfat-Lösung verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden bei 50°C in einem Eppendorf-Mastercycler für fünf Stunden inkubiert. Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurde die Lösung herauspipettiert und die Gefäße mit Wasser und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit einer 50mM Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit 50µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung bei pH9 für 20 Minuten bei 96°C. Nach dreimaligem

Waschen mit je 50 μ l Wasser sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifikation mittels PCR.

b) Verwenden von Polylysin Slides

- 5 Die Slides (Objektträger) werden zusammen mit den anzu-bringen DNA Molekülen für 3 Minuten bei 42°C in wäss-rigerem Medium inkubiert. Dabei werden die DNA Moleküle gleichmäßig auf der Slide-Oberfläche verteilt. Danach werden die Slides 10 Sekunden auf einer Heizplatte bei
10 einer Temperatur von 150°C inkubiert, wodurch die DNA an die Oberfläche gebunden wird. Um nicht gebundene DNA zu entfernen werden die Slides dann für 5 Minuten mit NH4OH gewaschen. Zum Denaturieren werden die Slides anschlie-ßend für 1 Minute bei 95°C (H₂O) inkubiert und danach
15 sofort in 95% EtOH überführt wonach sie getrocknet wer-den:

Bisulphit Behandlung:

- Die angebundene DNA wird bei 96°C für 20 Minuten unter
20 Verwendung eines Adapters in einem Eppendorf-Mastercycler denaturiert. Für die Bisulfitreaktion wurde eine Natriumbisulfat-Lösung verwendet. Die Slides wurden bei 50°C in einem Eppendorf-Mastercycler für fünf Stunden inkubiert.
Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurden Slides mit Wasser und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit einer 50mM Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit
25 50 μ l einer 50mM Tris-HCl-Lösung bei pH9 für 20 Minuten bei 96°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 μ l Wasser sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifi-kation mittels PCR.

Beispiel 2:

- Primer Verlängerung (extension) unter Verwendung der DNA
35 des Gens p15

Die an einer festen Phase gebundene DNA des Gens p15 (Accession Nummer NM_004936) diente, nachdem sie wie oben beschrieben mit Bisulphit behandelt wurde, als Ausgangsmaterial für die Primer Verlängerung. Für die Primer Verlängerung wurden 2pmol des Primers mit der Sequenz 5 GTTTAGGTTTTAGGAAGGAGAGTG (SEQ-ID 1) eingesetzt. Lag an der zu verlängernden DNA an der betreffen Stelle ein Guanin vor, so wurde bei dem verlängerten Primer ein markiertes Cytosin eingebaut (methylierter Zustand); lag da- 10 gegen ein Adenin vor, so wurde ein (verschieden) markiertes Thymin eingebaut (nicht methylierter Zustand). Gemäß Herstellerangaben (Amersham-Pharmacia) wurde ein Dideoxynukleotidgemisch mit jeweils verschiedenen markierten Nukleotiden für die Extension verwendet. Die Bedingungen 15 waren: 96°C, 10sec; 55°C, 5sec und 60°C, 10sec. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Für die Polylysine Slides erfolgte der Nachweis der verlängerten Sequenz mit dem Scanner Axxon 4000A (Axxon Instruments) unter Benutzung der Software GenePix Pro V. 3.0. Die Durchführung der 20 Primer Verlängerung im Reaktionsgefäß erfolgte analog.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in
5 DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass die folgen-
den Verfahrensschritte ausgeführt werden:
 - a) aus einer Probe wird DNA extrahiert,
 - 10 b) die DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit
(=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass
Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der
DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt
wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
 - 15 c) ein oder mehrere Oligonukleotidprimer werden an
die behandelte DNA hybridisiert,
 - 20 d) die hybridisierten Primer werden in einer Polyme-
raseraktion verlängert, wobei markierte Nukleotide im
wesentlichen nur dann eingebaut werden, wenn in der
behandelten DNA nach Schritt b) noch Cytosinbasen vor-
lagen und wobei das Ausmass des Einbaus der markier-
ten Nukleotide zu der Methylierung in der zu untersu-
chenden DNA-Probe korreliert,
 - 25 e) die in der Polymeraseraktion nicht eingebauten
markierten Nukleotide werden entfernt,
 - 30 f) die Anzahl der Markierungen in dem durch die Pri-
merverlängerung erzeugten Fragment wird näherungswei-
se bestimmt, indem eine von diesen Markierungen aus-
gehende Signalintensität gemessen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Kör-
perflüssigkeiten eines Individuum gewinnt.
- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Proben DNA aus Zelllinien, Blut, Sputum,
Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit,
in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Ge-
webe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata,
10 Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern
und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung nach
15 Anspruch 1b) mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogen-
sulfit) durchführt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,
dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA
20 in Agarose oder besonders bevorzugt nach Bindung der
DNA an eine Oberfläche erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,
dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex
25 denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger
zugegen ist.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass aus einer Probe genomi-
30 sche DNA extrahiert wird und dabei an eine Oberfläche
gebunden wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,
dass diese Bindung durch Hybridisierung an ein immo-
35 bilisiertes Oligonukleotid erfolgt.

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die extrahierte DNA vor der Bindung durch Restriktionsenzyme gespalten wird.
- 5 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man an die behandelte DNA mehrere verschiedene Oligonukleotide als Primer hybridisiert.
- 10 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die markierten Nukleotide Guaninderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11. dadurch gekennzeichnet, dass das Ausmaß des Einbaus der Guaninbasen und damit auch die Anzahl der eingebauten Markierungen proportional zu der Methylierung in der zu untersuchenden DNA-Probe.
- 20 13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerasereaktion an der Position bevorzugt endet, die vor der DNA Isolierung durch den Einsatz einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurde.
- 25 14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in der Polymerasereaktion nicht eingebauten markierten Nukleotide durch Waschschritte entfernt werden und die DNA an eine Oberfläche gebunden vorliegt.
- 30 15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluor-

reszenzmarkierungen, Radionuklide, Chemiluminiszenzmarkierungen oder abspaltbare Massenmarkierungen sind, welche in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

5

16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen indirekt durch Bindung eines wiederum anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden.

10

17. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet dass die behandelte DNA-Probe nach Schritt 1b) des Anspruchs 1 unter Verwendung von bevorzugt mindestens zwei Primeroligonukleotiden mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.

15

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die markierten Nukleotide Cytosinderivate sind, wobei diese in der Polymerasereaktion nur dann wesentlich eingebaut werden, wenn in der DNA Probe an den entsprechenden Positionen Cytosin-Methylierung vorlag.

20

25

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchgeführt wird.

30

20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Methylierungsstatus von mehr als 10 Methylierungspositionen der zu analysierenden DNA in einem Experiment nachgewiesen wird.

35

21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei mindestens einer der

Amplifikationen einer der jeweiligen Primer an eine Festphase gebunden ist.

22. Verfahren nach einem der voranstehenden, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifizate insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
5
23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen; wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-
10 Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeits-störungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kar-
15 diovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehl-funktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als
20 Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabo-lische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopf-
25 schmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
30
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen o-
der Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferen-zierung.
35

-25. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, mindestens einem Primer für die Polymerasereaktion, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-22.

1/1

Fig 1